

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Virchow Klinikum und Campus Charité Mitte
(Direktor: Professor Dr. med. N. Suttorp)

HABILITATIONSSCHRIFT

Pathogenesis of *Chlamydophila pneumoniae*- mediated diseases

zur Erlangung der Venia legendi für das Fach
Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité

von

Dr. med. Matthias Krüll

geboren am 27.01.1968 in Karlsruhe

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. E. Straube, Jena

2. Prof. Dr. med. H.-J. Schnittler, Dresden

eingereicht: Juni 2006

**Für Ulli
und meine Eltern
Ursula und Harald Krüll**

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	3
II Zusammenstellung ausgewählter Publikationen (chronologisch)	5
III Liste der Abkürzungen	8
Abstract (engl.)	10
Abstract (dt.)	11
1 Introduction	12
2 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> mediated diseases	12
2.1 Epidemiology, diagnosis and clinical manifestation	12
2.1.1 Epidemiology	13
2.1.2 Diagnosis	14
2.2 Cell biology	16
2.3 Virulence factors	19
2.3.1 Chlamydial envelope/outer membrane complex	19
2.3.2 Chlamydial heat shock protein 60 (cHsp60, GroEL-1)	20
2.3.3 Chlamydial LPS	21
2.3.4 Chlamydial protease- or proteasome-like activity factor (CPAF)	22
2.3.5 Type III secretion system (TTS)	22
2.4 Clinical manifestation	23
2.4.1 <i>C. reinhardtii</i> and respiratory diseases	23
2.4.2 <i>C. reinhardtii</i> and vascular diseases	26
2.5 Innate and adaptive immunity	28
2.5.1 Innate immunity	29
2.5.2 Adaptive immunity	31
2.6 <i>C. reinhardtii</i> -mediated signal transduction in target cells	34
3 Objectives	38
4 Own Work	39

4.1	Importance of airway epithelial cells	39
4.2	Importance of endothelial cells	41
4.2.1	Endothelial cells as targets of pathogens	41
4.2.2	Endothelial cell infection and activation by <i>C. pneumoniae</i>	43
4.2.3	Signal transduction pathways activated in target cells	45
5	Discussion	46
5.1	<i>C. pneumoniae</i> and respiratory diseases	46
5.2	<i>C. pneumoniae</i> and vascular diseases	48
5.3	Mechanisms of target cell infection and activation	50
5.3.1	Dead or Alive ?	50
5.3.2	Importance of chlamydial virulence factors	51
5.3.3	Importance of target cell receptors	52
5.4	Future research and therapeutic strategies	54
6	Summary	55
7	References	56
8	Danksagung	83
9	Eidesstattliche Versicherung	84

II Zusammenstellung ausgewählter Publikationen (chronologisch)

Krüll M., C. Dold, S. Hippenstiel, S. Rosseau, J. Lohmeyer, and N. Suttorp. *Escherichia coli* hemolysin and *Staphylococcus aureus* alpha-toxin potently induce neutrophil adhesion to cultured human endothelial cells.

J. Immunol. 157:4133-4140, 1996. **1 K**

Krüll, M., R. Nöst, S. Hippenstiel, E. Domann, T. Chakraborty, and N. Suttorp. *Listeria monocytogenes* potently induces upregulation of endothelial adhesion molecules and neutrophil adhesion to cultured human endothelial cells.

J. Immunol. 159:1970-1976, 1997. **2 K**

Schwarzer, N., R. Nöst, J. Seybold, S. K. Parida, O. Fuhrmann, M. Krüll, R. Schmidt, R. Newton, S. Hippenstiel, E. Domann, T. Chakraborty, and N. Suttorp. Two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* induce ceramide generation, nuclear factor-kappa activation, and E-selectin expression in human endothelial cells.

J. Immunol. 161:3010-3018, 1998. **3 K**

Krüll, M., A. C. Klucken, F. N. Wuppermann, O. Fuhrmann, C. Magerl, J. Seybold, S. Hippenstiel, J. H. Hegemann, C. A. Jantos, and N. Suttorp. Signal transduction pathways activated in endothelial cells following infection with chlamydia pneumoniae.

J. Immunol. 162:4834-4841, 1999. **4 K**

Jahn, U.*, Krüll, M.*, F. N. Wuppermann, A. C. Klucken, S. Rosseau, J. Seybold, J. H. Hegemann, C. A. Jantos, and N. Suttorp. Infection and activation of airway epithelial cells by *Chlamydia pneumoniae*.

J. Infect. Dis. 182:1678-1687, 2000. (*both authors equally contributed) **5 K**

Hippenstiel S, S. Soeth, B. Kellas, O. Fuhrmann, J. Seybold, M. Krüll, C. v. Eichel-Streiber C, M. Goebeler, S. Ludwig, and N. Suttorp Rho proteins and the p38-MAPK pathway are important mediators for LPS-induced interleukin-8 expression in human endothelial cells.

Blood 95:3044-3051, 2000. **6 K**

Fuhrmann, O., M. Arvand, M. Krüll, S. Hippenstiel, J. Seybold, C. Dehio and N. Suttorp. *Bartonella henselae* outer membrane proteins (omp) induce NF- κ B-dependent upregulation of adhesion molecules and subsequent neutrophil adhesion to human endothelial cells.

Infect. Immun. 69:5088-5097, 2001. **7 K**

Mayer, K., M. Merfels, M. Muhly-Reinholz M, S. Gokorsch, S. Rosseau, J. Lohmeyer, N. Schwarzer, M. Krüll, N. Suttorp, F. Grimminger, and W. Seeger. Omega-3 fatty acids suppress monocyte adhesion to human endothelial cells: role of endothelial PAF generation.

Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 283:H811-818, 2002. **8 K**

Hippenstiel, S., M. Witzenrath, B. Schmeck, A. Hocke, M. Krisp, M. Krüll, J. Seybold, W. Seeger, W. Rascher, H. Schütte, and N. Suttorp. Adrenomedullin reduces endothelial hyperpermeability. *Circ. Res.* 91:618-625, 2002. **9 K**

Wissel, H., C. Schulz, M. Rüdiger, M. Krüll, P. A. Stevens, and R. R. Wauer. *Chlamydia pneumoniae* affect surfactant trafficking and secretion due to changes of type II cell cytoskeleton.

Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 29:303-313, 2003. **10 K**

Walter, C., J. Zahlten, B. Schmeck, C. Schaudinn, S. Hippenstiel, E. Frisch, A. C. Hocke, N. Pischon, H. K. Kuramitsu, J. P. Bernimoulin, N. Suttorp, and M. Krüll. *Porphyromonas gingivalis* strain-dependent activation of human endothelial cells.

Infect. Immun. 72:5910-5918, 2004. **11 K**

Krüll, M., J. Kramp, T. Petrov, A. C. Klucken, A. C. Hocke, C. Walter, B. Schmeck B, J. Seybold, M. Maass, S. Ludwig, J. G. Kuipers, N. Suttorp, and S. Hippenstiel. Differences in cell activation by *Chlamydophila pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis* infection in human endothelial cells.

Infect. Immun. 72:6615-6621, 2004. **12 K**

Rosseau, S., K. Wiechmann, S. Moderer, J. Selhorst, K. Mayer, M. Krüll, A. C. Hocke, H. Slevogt, W. Seeger, N. Suttorp, J. Seybold, and J. Lohmeyer. *Moraxella catarr-*

rhalis-infected alveolar epithelium induced monocyte recruitment and oxidative burst.
Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 32:157-166, 2005. **13 K**

Wissel, H., T. Müller, M. Rüdiger, M. Krüll, and R. R. Wauer. Contact of *Chlamydo-
phila pneumoniae* with type II cell triggers activation of calcium-mediated NF-kappaB
pathway.
Biochim Biophys Acta. 1743:37-48, 2005. **14 K**

Opitz, B., S. Förster, A. C. Hocke, M. Maass, B. Schmeck, S. Hippenstiel, N. Suttorp,
and M. Krüll. Nod1-mediated endothelial cell activation by *Chlamydo-
phila pneumo-
niae*.
Circ. Res. 96:319-326, 2005. **15 K**

Krüll, M., M. Mass, N. Suttorp, and J. Rupp. *Chlamydo-
phila pneumoniae* – mecha-
nisms of target cell activation.
Thromb. Haemost. 94:319-326, 2005. **16 K**

Krüll, M., P. Bockstaller, F. N. Wuppermann, A. C. Klucken, J. Mühling, B. Schmeck,
J. Seybold, C. Walter, M. Maass, S. Rosseau, J. H. Hegemann, N. Suttorp, and S.
Hippenstiel. Mechanisms of *Chlamydo-
phila pneumoniae* mediated GM-CSF release
in human bronchial epithelial cells.
Am. J. Resp. Cell Mol. Biol. 34:375-382, 2006. **17 K**

Krüll, M., F. N. Wuppermann, C. Scheiber, J. Kramp, J. Seybold, J. Mühling, M.
Maass, J. H. Hegemann, N. Suttorp, and S. Hippenstiel. *Chlamydo-
phila pneumoniae*
heat shock protein-60 mediated target cell activation.
Infect. Immun. In reply. 2006. **18 K**

III Liste der Abkürzungen

CAP	Community acquired pneumonia
CARD	Caspase recruitment domain
CHD	Coronary heart disease
CLSM	Confocal laser scanning microscopy
CMI	Cell mediated Immunity
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
COX	Cyclooxygenase
CPAF	Chlamydial protease- or proteasome-like activity factor
CTL	Cytotoxic T-lymphocyte
EB	Elementary Body
ERK	Extracellular signal-activated protein kinase
FDA	Food and drug administration
GAG	Glycosaminoglycan
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HAEC	Human arterial endothelial cell
HlyA	<i>E. coli</i> hemolysin
Hsp	Heat shock protein
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
I κ B	Inhibitor of NF- κ B
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
EC	Endothelial cells
IFN γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobuline
IHC	Immunohistochemistry
IKK	I κ B Kinase
IL1 β	Interleukin-1 β
IL-8	Interleukin-8
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MIF-test	Microimmunofluorescence test
MOMP	Major outer membrane protein
NF- κ B	Nuclear factor- κ B

Nod-protein	Nucleotide-binding oligomerization domain protein
NO(S)	Nitric oxide syntase
OMP	Outer membrane protein
PAF	Platelet activating factor
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PCR	Polymerase chain reaction
PG	Peptidoglycan
PGE ₂	Prostaglandin-E ₂
PGI ₂	Prostacycline-I ₂
PKC	Protein kinase C
PLC	Phospholipase
PMN	Polymorphonuclear neutrophile granulocyte
POMP	Polymorphic outer membrane protein
RB	Reticulate Body
SAEC	Small airway epithelial cell
SAPK	Stress activated protein kinase
SP-A	Surfactant protein A
TcdB	<i>Clostridium difficile</i> toxin-B
TEM	Transmission electron microscopy
TLR	Toll-like receptor
TNF α	Tumor necrosis factor- α
TTS	Typ III secretion system
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VSMC	Vascular smooth muscle cells

Abstract (engl.)

Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae, a Gram-negative obligate intracellular bacterium, is a widespread respiratory pathogen causing sinusitis, pharyngitis, bronchitis and pneumonia. Repetitive or chronic persistent infections as a trigger/promoter of inflammation have been associated with an increased risk for asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) or vascular lesions. Although the genome of *C. pneumoniae* has been sequenced completely this information has not led yet to an understanding of the mechanisms of infection and target cell activation nor to the identification of potential chlamydial virulence factors. This work will give an overview on the pathogenesis of *C. pneumoniae*-induced acute and chronic infections. It will especially focus on mechanisms of target cell activation via putative host cell receptors and subsequently activated signal transduction pathways in epithelial and endothelial cells.

Abstract (dt.)

Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae, ein weitverbreitetes Gram-negatives, obligat intrazelluläres Bakterium, ist ein häufiger Erreger respiratorischer Infektionen. Neben Bronchitiden, Sinusitiden und Pharyngitiden kann *C. pneumoniae* eine sogenannte atypische, lymphozytär geprägte Pneumonie hervorrufen. Repetitive/rezidivierende oder persistierende Infektionen mit *C. pneumoniae* werden als pathogenetisch bedeutsam für die Entwicklung chronischer respiratorischer Erkrankungen (Asthma bronchiale, chronisch obstruktive Bronchitis/COPD) sowie vaskulärer Läsionen mit dem vermehrten Auftreten von koronarer Herzkrankheit (KHK) und Arteriosklerose betrachtet. Obwohl das Genom von *C. pneumoniae* seit 1999 vollständig sequenziert ist, sind die Mechanismen der Wirtszellinfektion (Adhäsion, Invasion) und -aktivierung sowie die Bedeutung verschiedener chlamydialer Virulenzfaktoren weitgehend offen. Diese Arbeit gibt eine Übersicht über die Pathogenese akuter und chronischer *C. pneumoniae*-assoziierter Erkrankungen und fokussiert hierbei insbesondere auf die Mechanismen der Zielzellinfektion über potentielle Wirtszellrezeptoren sowie die nachfolgend aktivierten Signalübertragungswege in Epithel- und Endothelzellen.

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem akademischen Lehrer **Prof. Dr. N. Suttorp**, Direktor der Med. Klinik m. S. Infektiologie und Pneumologie, Charité, Universitätsmedizin Berlin. Er hat mich mit viel persönlichem Engagement immer wieder zur Umsetzung eigener Ideen motiviert, und hat mit vielen konstruktiven Diskussionen geholfen, nicht den Überblick zu verlieren und einen „klaren Kurs“ zu halten.

Danken möchte ich auch meinen vielen Kolleginnen und Kollegen aus der Arbeitsgruppe. Vor allem die enge Zusammenarbeit und die kontroversen Diskussionen mit **PD Dr. Stefan Hippenstiel**, **Dr. Joachim Seybold** und **Andrea C. Klucken** haben sicher wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke den technischen Angestellten (alphabetisch) unserer Arbeitsgruppe in Giessen **Petra Becker**, **Heike Geisel** und **Dipl. Ing. Susanne Tannert-Otto** sowie in Berlin **Valerie Jonston**, **Kerstin Möhr**, **Doris Stoll** und **Sylvia Schapke**, die Dank Ihres unermüdlichen Einsatzes und Ihrer großen Geduld halfen, den langen Weg von der ersten isolierten Zelle zur fertigen Arbeit auf den Punkt zu bringen.

Diese Arbeit konnte nur mit der Unterstützung der Koautoren der genannten Publikationen - allen voran **Prof. Dr. M. Maaß** - entstehen. Ihnen allen sei an dieser Stelle für die überaus fruchtbare Zusammenarbeit herzlich gedankt.

Clemens danke ich für die vielen gemeinsamen Erfahrungen im beruflichen und vor allem privaten Leben.

Bei der **Deutschen Forschungsgemeinschaft** und dem **Bundesministerium für Bildung und Forschung** bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank geht zum Schluß an meine **Familie**. Meine **Eltern** haben mich während meines Studiums und in den folgenden Jahren in all meinen Entscheidungen konsequent und vorbehaltlos unterstützt. **Ulli** danke ich dafür, dass sie mir gezeigt hat, wie entscheidend bei allem im Leben die nötige Prise Glück ist. Sie hat mir die Kraft gegeben, diese Arbeit konsequent umzusetzen!

9 Eidesstattliche Versicherung

gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.